

Staphylococcus aureus biofilm

Citation for published version (APA):

Croes, S. (2012). *Staphylococcus aureus biofilm*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20120427sc>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120427sc](https://doi.org/10.26481/dis.20120427sc)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 10

Summary



Summary

During recent decades it has been discovered that many serious chronic and/or recurrent infections including endocarditis, osteomyelitis and CVC-related bacteremia are biofilm associated. Upon initial adherence to a surface, bacteria consequently become embedded in a selfproduced protective matrix consisting of a mixture of bacterial components and substances extracted from the environment. The biofilm matrix forms a surrounding protective barrier against host defences and antibiotic treatment. Unravelling the principles behind this survival strategy contribute to the goal-oriented design and application of preventive anti-biofilm technologies in biomaterial science and can lead to novel ways to reinforce the destruction of pre-existing mature biofilm.

In contrast to *Staphylococcus epidermidis* biofilm, most *Staphylococcus aureus* biofilm are extracellular polysaccharides (mostly referred as PIA, PNAG or slime) independent, as we found when evaluating 254 *S. aureus* clinical isolates by means of Congo red agar (CRA) screening. On CRA plates, only 9% of the strains displayed a distorted morphology, associated with slime formation (**chapter 2**). CRA-screening is therefore not useful as a high-throughput screening assay for *S. aureus* biofilm formation. To find out whether the genetic background is a predisposing factor for biofilm development, the total accumulated amount of biomass in polystyrene micro-titre plates within 24 h was related to the genetic background. At the physiologic blood glucose concentration (0.1%), more than 60% of the *S. aureus* strains associated with multilocus sequence typing (MLST) clonal complex (CC)8 produced large amounts of biomass compared to 0–7% for various other clonal lineages. The strong biofilm forming capacity of the CC8 associated strains was observed both for bloodstream isolates as well as for their commensal counterparts (**chapter 2**). Accessory gene regulator (*agr*) type II has been previously put forward as predisposing factor for promoting abundant biofilm formation. We did not find this correlation, since strains with *agr*-II genotype includes also genetic backgrounds that did not produce large amounts of biomass, such as CC15, CC12, and *spa*-types associated with MLST CC5. However, it was confirmed that various strains with *spa*-type t002 were indeed strong biofilm formers. In general, strains with *spa*-type t002 have been frequently isolated from patients with orthopaedic device-related infections.

It is known that bacteria embedded in biofilm are far more recalcitrant to antibiotics than their planktonic counterparts. Nevertheless, rifampicin is often used as adjunctive agent to empirically initiated therapy in situations of clinical suspicion of biofilm involvement. The rationale for recommending rifampicin administration is based on the ability to penetrate into biofilm and a presumed activity against dormant bacteria. Rifampicin has been extensively investigated for prosthetic device-related infections and found beneficial in terms of clinical and/or bacteriological cure rates. However, the number of studies for other indications is limited and the outcome often contradictory. Moreover, rifampicin resistant strains have emerged during treatment. As rifampicin diffuses more quickly into the biofilm than the companion agent, it would be logical that without proper destruction of biomass

rifampicin resistant subpopulations emerge. These could be responsible for persistent or re-occurring infections. It was hypothesized that if rifampicin possesses pore-forming or matrix destructive capabilities, rifampicin with a companion agent should be effective against rifampicin-resistant embedded bacteria. Using a static *in vitro* biofilm assay, this concept was evaluated in **chapter 3** with oxacillin alone or in combination with rifampicin against biofilm formed by rifampicin-susceptible or isogenic rifampicin-resistant methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA). Rifampicin (1 µg/mL) added to oxacillin enhanced the reduction in biomass produced by most rifampicin-susceptible isolates compared to oxacillin alone. However, the greater reductions achieved were highly variable, ranging from 17 to 54% compared to 4% for oxacillin alone. Strains embedded by more biomass at the moment of initial exposure showed a diminished reduction in viable count. None of the biofilm formed by isogenic rifampicin-resistant mutants yielded a synergistic reduction in biomass and viable count upon rifampicin addition to oxacillin. Rifampicin as adjunctive agent is therefore unwarranted against biofilm formed by rifampicin-resistant strains and is unpredictable in case of unknown rifampicin susceptibility. Especially since rifampicin resistance can be easily induced in the absence of a companion agent, which might be the result of slower diffusion into the biofilm.

Substances suitable for intravenous application that specifically destruct preformed mature biofilm are under investigation but are not or rarely available on the market yet. A more straight-forward approach is to prevent biofilm formation. Since biofilm formation mostly starts with initial attachment to a surface, this step should be hindered to prevent biofilm formation. As adhesion and thrombus formation are interrelated we aimed in **chapter 4** and **5** to develop coatings for central venous catheters (CVCs) that are both anti-microbial and anti-thrombogenic as well. For this purpose, hydrophilic bifunctional biocompatible coatings containing sodium heparin and silver particles were systematically developed. The coatings were examined in different *in vitro* test settings. Blood compatibility was assessed through thrombin generation and thrombocyte adherence assays, while exit-site experiments and long-term challenge tests were employed to investigate bacterial adherence and killing. Adhesion of both reference strain (ATCC 29213) and clinical isolates of *S. aureus* was strongly inhibited by silver alone, but surprisingly, heparin augmented the antimicrobial activity of silver, while maintaining its anticoagulant function. The effect of changing the coating's hydrophilicity, the type of silver stabilization or the silver content was also assessed. The less hydrophilic SlipSkin® material (SS70:30), with a NVP/BMA molar ratio of 70/30, was expected to have slower release of embedded heparin, and –hence– a more sustained antimicrobial effect due to a long-lasting improved mobility of silver particles. Our expectations were confirmed with the pre-washing experiments, demonstrating that the longer the pre-wash with milliQ water, the more *S. aureus* cells adhered to SS90:10-Ag-Hep at the moment of bacterial exposure, while the number of adhered bacteria remained constant over time when SS70:30-Ag-Hep specimens were more intensively pre-washed. Doubling the silver content (SS70:30-Ag_{2x}-Hep) did not improve the long-term prevention of adherence of *S. aureus* and reduced the viable count in the time-kill assays to a similar extent as the specimens containing the standard content of silver (SS70:30-Ag-Hep).

All experimental results taken together with observations described in the literature pointed out that antimicrobial synergy of heparin and silver is best explained by binding of Ag^+ ions to heparin within the swollen coating, consequently followed by release of Ag^+ -heparin ligand-carrier complexes upon immersion of the coatings in an aqueous environment such as blood.

It is generally accepted that the recalcitrance to antibiotics, and also the inability of the host's immune system to clear *S. aureus* biofilm, cannot be solely attributed to the diffusion barrier formed by the matrix. Due to the cramped conditions inside the deeper parts of the biofilm, it is likely that locally a waste disposal problem exists. As described by others, the matrix structure is partially interspersed with channels that are considered essential for nutrition and oxygen support and waste drainage. Still, the supply of nutritious substances is believed to be insufficient, which may clarify the dormancy of embedded bacteria. The high consumption of nutrients, necessary to produce extracellular polymeric substances (EPS) for the matrix, very likely exacerbates the waste management difficulty. Enhanced extrusion of toxic components from the cytosol via upregulation of transmembrane transporters has been suggested as a manner to help pass off toxins.

In first instance we investigated whether certain clonal lineages of *S. aureus* were more prone to mutations in the promoter region of the *norA* gene. NorA is one of the main efflux transporter proteins in *S. aureus*. As notified in **chapter 6**, we showed that the overexpression of *norA* was associated with sequence types of all three known NorA alleles, i.e. *norA* wt, *norA1199* and *norAII*. But the overexpressing strains were restricted to a few clonal lineages including (mainly methicillin resistant) *S. aureus* strains associated with MLST CC5, CC30 and CC45. The question remained whether these mutations would lead to augmentation of efflux pump expression whenever these strains become embedded into a biofilm. Recent observations already pointed out that efflux pump inhibitors (EPIs) like reserpine or thioridazine could prevent *in vitro* biofilm formation of a single tested CC8-associated *S. aureus* strain. We incorporated strains associated with MLST CC8, CC22, CC5 and CC30 in our *in vitro* experiments to test whether reserpine and thioridazine could prohibit initial attachment. We confirmed that under 0.1% glucose conditions thioridazine effectively prevented biomass formation of CC8 associated strains (**chapter 7**). Interestingly, this genetic background was not linked to *norA* overexpression, since no mutations that could lead to *norA* hyperexpression were detected among our collection of CC8 isolates ($n=41$). There was no effect of EPIs on pre-mature biofilm of CC22 associated strains. Biomass production of CC30 and CC45 associated strains was specifically prevented by thioridazine at a higher supplemental glucose concentration, i.e. 1%. Independent of the genetic background, reserpine was inferior to thioridazine in the prevention of biomass accumulation at both tested glucose concentrations. Remarkably, at 1% glucose, biomass formation of MLST CC8-associated strains was elevated upon exposure to both EPIs. We presume that thioridazine and reserpine have a non-specific affinity for a variety of transporters, including nutrient-importers and toxin exporters. This would consequently implicate that glucose availability and/or metabolism influences the effects of EPIs on biofilm formation. Blocking glucose importers at 0.1% glucose (extracellular concentration) would result in suppression of biomass formation, especially among strains with a high carbohydrate

uptake capacity, since a deficiency in intracellular amount of glucose would lead to tricarboxylic acid (TCA) cycle activation. Enhancement of TCA cycle intermediates is known to correlate with biofilm repression. Abundantly imported amounts of carbohydrates at 1% glucose would theoretically result in intracellular acidification due to an inactive TCA cycle and the conversion to acetate. Concerning the CC8-associated strains, we hypothesized that blocking the efflux of acidic metabolites, such as acetate, promotes – instead of prevents – biomass formation, while influx of glucose is not much affected by the excessive availability in the environmental medium.

In conclusion, the glucose and oxygen presence within microbial biofilm communities is changing over time, which concomitantly modifies the TCA cycle activity of the embedded bacteria. Unique accumulation molecules and metabolic heterogeneity have been observed on a large-scale basis by others. We hypothesized that the biofilm life-cycle turnover is clonal lineage specific, as is the expression of transmembrane transporters during the different consecutive stages of biofilm formation. This makes EPIs inappropriate in the prevention of early biomass accumulation.

The impact of EPIs on pre-existing mature biofilm was also evaluated and biofilm disassembly was less pronounced (CC8) or even absent (CC22, CC30 and CC45) compared to the prevention of biomass formation. It seems that the penetration barrier of mature biofilm for most antibiotics also clearly exist for the EPIs themselves.

The biofilm matrix could retain waste materials by improper functioning of down-regulated transmembrane transporters, but could also keep excreted substances necessary for their defence in their immediate surrounding vicinity. As noticed previously, entrapment and accumulation of β -lactamases inside the biofilm occurs. Borderline oxacillin-resistant *S. aureus* (BORSA) are potentially interesting in this context, since these strains have been associated with the hyperproduction of β -lactamases (penicillinases and/or methicillinases). In **chapter 8** we investigated a collection of BORSA isolates in order to unravel whether they could be killed under planktonic conditions with a standard β -lactam antibiotic, i.e. oxacillin. Time-kill curves analysis was also performed with comparative alternatives of oxacillin, such as vancomycin, daptomycin and linezolid. Plasmid profile analysis revealed that a part of our collection of BORSA strains, with oxacillin MIC ≤ 2 mg/L and including the BORSA reference strain VU94, possesses a pBORa53-like plasmid that encodes for β -lactamases including methicillinases. In the other BORSA, with oxacillin MIC ≥ 4 mg/L, pMW2-like penicillinase-encoding plasmids were identified. The pBORa53-like plasmid containing BORSA showed markedly more regrowth in the time kill curve studies when testing in the presence of oxacillin. The oxacillin killing activity was also attenuated against BORSA with oxacillin MIC ≥ 4 mg/L compared to ATCC 29213 (MSSA reference strain), since the pharmacodynamic parameter (EC_{50} or ϵC_{50}) revealed that the potency of oxacillin was markedly reduced (approximately 10 \times). Since these BORSA do not produce methicillinases upon induction by oxacillin, it was anticipated, but yet not proven, that these BORSA obtained modifications in the penicillin-binding proteins (PBPs) 1, 2 and/or 4 genes. Further investigation into β -lactam dosing strategies against different type of BORSA strains is warranted in order to avoid putative therapy failure. We discovered that not all BORSA are equally interesting for biofilm related research. Especially the pBORa53-

like plasmid-containing BORSA should be evaluated in biofilm experimental settings, since they are the most sensitive to β -lactamase (methicillinase) induction. However, a recently performed pilot experiment (data not shown) revealed that our pBORa53-like plasmid-containing BORSA, which belonged to the associated MLST clonal lineage CC25 were not capable to produce large amounts of biomass at 0.1% glucose, when compared to the MSSA and MRSA isolates associated with MLST CC8. Nevertheless, it could be interesting to introduce BORSA strains in multi-species biofilm.

Additional to the main purpose of these findings, we examined an alternative method to evaluate time-kill data. When performing time-kill analysis, it should be recommended to take pharmacodynamic parameters into account as efficacy markers in addition to traditional end-points, like “time to 99.9% kill” or presenting the number of remaining CFU/mL at a certain time point. These traditional methods to present efficacy data do not properly reflect all available time-kill data, including e.g. regrowth or alterations in the growth rate over time. By taking the absolute difference in \log_{10} viable count between growth or killing in the absence and presence of an antibiotic, i.e. the area between the curves over 24h (ABC_{0-24h}), all available time-kill data could be incorporated in the concentration-effect parameters.

Nederlandse samenvatting

Samenvatting

In de laatste decennia heeft men ontdekt dat chronische en recidiverende infecties waaronder endocarditis, osteomyelitis en centraal-veneuze catheter (CVC)-gerelateerde bacteriëmiën biofilm geassocieerd zijn. Na initiële aanhechting van bacteriën aan een oppervlak zorgen deze er vervolgens voor dat ze zich inkapselen in een zelfgeproduceerde matrix bestaande uit bacteriële componenten en substanties die zijn onttrokken uit hun nabije omgeving. Deze biofilm matrix waarin de bacteriën zich bevinden biedt bescherming tegen het menselijke afweersysteem en antimicrobiële therapieën. Het ontrafelen van de mechanistische principes van deze overlevingsstrategie van bacteriën, zal bijdragen aan doelgerichte anti-biofilm toepassingen om al gevormde biofilm te kunnen afbreken en aan het ontwikkelen van biomaterialen die biofilm vorming kunnen voorkomen.

In tegenstelling tot *Staphylococcus epidermidis* biofilm bestaat de matrix van *Staphylococcus aureus* biofilm zelden uit extracellulaire polysaccharides, ook wel aangeduid als bacterieel slijm of PNAG (Poly- β (1,6)-N-acetyl-D-glucosamine). Dit is overeenkomstig onze bevindingen met de Congo rood agar (CRA) test van 254 klinische *S. aureus* isolaten. Bij de beoordeling van de kolonies op de agar platen bleek dat slechts 9% van de stammen een afwijkende morfologie, kenmerkend voor slijmvormende stammen, vertoonden (**hoofdstuk 2**). De CRA screenings test is om deze reden niet geschikt als diagnostische bepalingsmethode om biofilmvorming van *S. aureus* mee aan te tonen. Om na te gaan of de genetische achtergrond van de bacterie een predisponerende factor is voor biofilmvorming, werd de totale hoeveelheid biomassa die in 24 uur werd geproduceerd gerelateerd aan de genetische achtergrond van de betreffende bacterie. Bij een fysiologische glucose concentratie van 0,1% was 60% van de *S. aureus* stammen met een multilocus sequence typing (MLST) klonaal complex (CC)8 geassocieerde genetische achtergrond in staat een bovengemiddeld grote hoeveelheid biomassa te genereren terwijl dit voor stammen met andere genetische achtergronden maar in 0-7% van de gevallen gold. De goede biofilm vormende eigenschap van de CC8 geassocieerde stammen werd zowel bij bloedstroom als commensale isolaten waargenomen (**hoofdstuk 2**). Recent werd verondersteld dat het accessory gene regulator (*agr*) type II een predisponerende factor zou kunnen zijn voor het bevorderen van overmatige biofilm vorming. Deze correlatie hebben wij niet kunnen bevestigen. Immers stammen met genetische achtergronden die geen sterke mate van biomassa vorming vertoonden, zoals *spa*-typen gerelateerd aan MLCT CC15, CC12 en CC5 behoren tot *agr* type II. Echter verschillende stammen met *spa* type t002 gerelateerd aan CC5 bleken wel degelijk sterke biofilm vormende eigenschappen te bezitten. Dit is overeenkomstig de bevindingen in de dagelijkse praktijk: stammen met *spa* type t002 worden veelvuldig geïsoleerd bij orthopedische patiënten met kunstmateriaal geassocieerde infecties.

Bacteriën omgeven door een biofilm zijn vele malen meer recalcitrant voor antibiotica dan wanneer deze in planktonische omstandigheden verkeren. Desalniettemin, wordt rifampicine vaak als additief toegevoegd aan reeds empirisch geïnitieerde antibiotische therapie,

met name in situaties met klinische verdenking op biofilm betrokkenheid. De reden voor de toevoeging van rifampicine is gebaseerd op de eigenschap van goede penetratie in biofilm en een veronderstelde activiteit tegen bacteriën in “ruste”. De toepassing van rifampicine bij prothese-gerelateerde infecties is uitvoerig bestudeerd en zowel ten aanzien van de kans op klinische verbetering als op vermindering van het aantal bacteriën is de meerwaarde aangetoond. Echter, het aantal uitgevoerde onderzoeken met rifampicine voor andere indicaties is beperkt en/of de uitkomsten zijn tegenstrijdig. Ook is gebleken dat rifampicine resistente subpopulaties kunnen ontstaan tijdens rifampicine behandeling. Aangezien rifampicine vermoedelijk sneller diffundeert in de biofilm dan het antibioticum waaraan het is toegevoegd, is het logisch dat zonder goede afbraak van biomassa rifampicine resistente subpopulaties ontstaan. Deze kunnen vervolgens aanleiding geven tot persisterende of recidiverende infecties. Indien rifampicine in staat zou zijn om poriën te vormen in de biofilm, of de matrix zou kunnen afbreken, dan zou rifampicine toegevoegd aan empirische therapie in staat moeten zijn om biofilm gevormd door rifampicine-resistente *S. aureus* stammen te verwijderen. Deze hypothese werd in **hoofdstuk 3** getest middels een statische *in vitro* biofilm opstelling waarbij biofilm, gevormd door rifampicine gevoelige of isogene rifampicine-resistente methicilline gevoelige *S. aureus* stammen, werden blootgesteld aan oxacilline alleen en in combinatie met rifampicine. Rifampicine (1 mg/L) toegevoegd aan oxacilline leidde bij rifampicine-gevoelige stammen in vrijwel alle gevallen tot een sterkere afname van de geproduceerde biomassa in vergelijking met blootstelling aan alleen oxacilline. De additionele reductie in biomassa varieerde voor de combinatie tussen de 17% en 54% in vergelijking met een afname van gemiddeld 4% voor oxacilline alleen. Stammen die initieel omgeven werden door meer biomassa waren minder gevoelig voor behandeling met rifampicine en oxacilline, zoals bleek uit het feit dat het aantal levende bacteriën per biofilm minder afnam. Een synergistische reductie in biomassa of in aantal levende bacteriën per biofilm ten gevolge van oxacilline en rifampicine blootstelling werd niet bereikt bij isogene rifampicine resistente mutanten. Om deze reden is rifampicine niet geschikt als additieve strategie tegen biofilm gevormd door rifampicine resistente stammen. Tevens is de meerwaarde van rifampicine onvoorspelbaar wanneer de rifampicine gevoeligheid onbekend is. Bovendien kan rifampicine resistentie op eenvoudige wijze worden geïnduceerd in de biofilm in lokale afwezigheid van een ander antibioticum. De kans hierop is aanwezig aangezien andere antibiotica langzamer diffunderen in de biofilm dan rifampicine. Daarom wordt in de kliniek gewacht met het toevoegen van rifampicine tot de bacteriële load verlaagd is.

Verschillende stoffen die een reeds gevormde volgroeide biofilm kunnen aantasten of afbreken, en die intraveneus kunnen worden toegediend, zijn nog niet of nauwelijks op de markt beschikbaar. Een alternatieve manier om biofilm vorming te lijf te gaan is het voorkomen van biofilm vorming door middel van preventieve maatregelen. Aangezien biofilm vorming start met aanhechting aan een oppervlak, is het duidelijk dat deze initiële stap verhinderd moet worden. Zoals beschreven in **hoofdstuk 4** en **5** zijn adhesie en trombus vorming aan elkaar gerelateerd. Om die reden werd een coating ontwikkeld voor centraal veneuze katheters (CVCs) die zowel antimicrobieel als antitrombogene is. Om dit te bereiken werden op systematische wijze hydrofiele bifunctionele biocompatibele coatings

ontwikkeld die zowel natriumheparine als zilver deeltjes bevatten. De coatings werden getest met behulp van verschillende *in vitro* meetopstellingen. De compatibiliteit met bloed werd onderzocht door middel van trombine generatie metingen en door microscopisch naar de aanhechting van trombocyten te kijken. Bacteriële aanhechting en afdoding werden geanalyseerd met behulp van langdurige blootstellingsexperimenten en de zogenaamde katheter-tip test. De adhesie van zowel een *S. aureus* referentie stam (ATCC 29213) als die van klinische isolaten werd in hoge mate verhinderd door coatings met alleen zilver. Het effect van zilver werd versterkt indien ook heparine in de coating was opgenomen. De anticoagulerende werking van heparine werd niet tenietgedaan door de aanwezigheid van zilver. Het effect van aanpassing van de hydrofiliciteit van de coating, de wijze waarop het zilver was gestabiliseerd en het veranderen van de hoeveelheid zilver per coating werd eveneens onderzocht. Het was de verwachting dat de minst hydrofiele samenstelling van het coatingsmateriaal SlipSkin® (SS70:30), met een NVP/BMA molaire ratio van 70/30, zou leiden tot een tragere afgifte van heparine. Dit zou dan bijdragen aan een verlengd antimicrobieel effect vanwege het feit dat de zilverdeeltjes onder invloed van heparine langduriger en tevens gelijkmatiger uit de coating zullen vrijkomen. Dit werd bevestigd met een experiment waarbij de coatings werden voorgewassen met milliQ water om langdurig gebruik te simuleren. Aangetoond werd met de SS90:10-Ag-Hep materialen, dat hoe langer er werd voorgewassen, des te meer *S. aureus* bacteriën konden aanhechten zodra de coatings werden blootgesteld aan bacteriën. Daarentegen bleef het aantal aangehechte bacteriën constant indien de SS70:30-Ag-Hep coatings intensiever werden voorgewassen. Het verdubbelen van de geïncorporeerde hoeveelheid zilver (SS70:30-Ag_{2x}-Hep) had geen effect op de lange termijn preventie ter voorkoming van *S. aureus* aanhechting. Tevens bleek het aantal bacteriën dat werd gedood per tijdseenheid gelijk aan de coatings met de standaard hoeveelheid zilver (SS70:30-Ag-Hep).

Wanneer we alle resultaten van de afzonderlijke experimenten gezamenlijk bekijken en deze vergelijken met de literatuur dan kan de waargenomen antimicrobiële synergie tussen heparine en zilver het best verklaard worden door binding van de zilverionen aan de heparinemoleculen in de opgezwollen coating gevolgd door het vrijkomen van de gevormde complexen na immersie van de coating in een waterige omgeving zoals bloed.

De algemeen geaccepteerde opvatting betreffende de recalcitrantie van *S. aureus* biofilm tegen antibiotica en het lichaamseigen afweersysteem is dat dit niet volledig kan worden toegeschreven aan de diffusiebarrière die gevormd wordt door de biofilmmatrix. De dichte opeenstapeling van bacteriecellen in de diepere lagen van de biofilm zouden er voor kunnen zorgen dat lokaal de afvalstoffen niet goed kunnen worden afgevoerd. Anderen beschreven dat de matrix kanalen bevat die als essentieel worden beschouwd voor de aanvoer van voedingsstoffen en zuurstof en de drainage van afvalstoffen. Desondanks wordt de beschikbaarheid van voedingssubstanties als ontoereikend beschouwd en vormt daarmee de gangbare verklaring voor de latentie van de omgeven bacteriecellen. De grote interne consumptie van nutriënten tijdens de opbouw- en/of uitbreidingsfase van de biofilm om voldoende extracellulaire polymere substantie (EPS) te vormen zorgt hoogstwaarschijnlijk voor een exacerbatie van het afvalstoffenprobleem. Er wordt verondersteld

dat via upregulatie van transmembraan transporters toxische componenten uit het cytosol verwijderd kunnen worden.

In eerste instantie onderzochten wij of bepaalde *S. aureus* klonale complexen vatbaarder zijn voor mutaties in de promotorregio van het *norA* gen. NorA is één van het meest voorkomende efflux transporter eiwitten in de celwand van *S. aureus*. In **hoofdstuk 6** is beschreven dat *norA* overexpressie voorkomt bij stammen van alle drie de bekende sequentie typen van het *norA* allel, namelijk *norA wt*, *norA1199* en *norAll*. Echter overexpressie kwam slechts bij een beperkt aantal klonale complexen voor. Dit waren voornamelijk methicilline-resistente *S. aureus* geassocieerd met MLST CC5, CC30 en CC45. De cruciale vraag die resteert is of de mutaties in de promotor regio van het *S. aureus norA* gen tot overexpressie van efflux pompen zou leiden indien deze stammen omgeven worden door een biofilm. Recent is met een enkele CC8-geassocieerde *S. aureus* stam waargenomen dat efflux pomp inhibitoren (EPIs) zoals reserpine of thioridazine preventief *in vitro* biofilm vorming konden verhinderen. Om te onderzoeken of initiële aanhechting van andere stammen ook door reserpine en thioridazine voorkomen kan worden werden verscheidene MLST CC8, CC22, CC5 en CC30 geassocieerde stammen getest met behulp van *in vitro* opstellingen. Zoals beschreven in **hoofdstuk 7**, kon bevestigd worden dat bij een glucose concentratie van 0,1% thioridazine inderdaad in staat is om biomassa vorming door CC8 geassocieerde stammen te vrijdelen. Opvallend is dat bij deze genetische achtergrond overexpressie van *norA* onwaarschijnlijk is aangezien in de gehele collectie van CC8 isolaten ($n=41$) geen mutaties in de promotorregio van *norA* werden gevonden die gerelateerd zijn aan *norA* overexpressie. De EPIs hadden geen effect op reeds volgroeide biofilm van stammen geassocieerd met MLST CC22. De biomassa productie van stammen geassocieerd met MLST CC30 en CC45 werd specifiek geremd bij een hogere glucose concentratie van het medium, namelijk 1%. Onafhankelijk van de genetische achtergrond bleek dat bij beide geteste glucose concentraties reserpine inferieur was ten opzichte van thioridazine in de preventie van biomassa vorming. Opmerkelijk is dat bij 1% glucose de biomassa vorming van de MLST CC8 geassocieerde isolaten bevorderd werd zodra deze werden blootgesteld aan de EPIs. Mogelijk hebben thioridazine en reserpine een niet specifieke activiteit voor een diversiteit aan transporters, zoals voor het opnemen van voedingsstoffen en het uitscheiden van toxische componenten. Derhalve impliceert dit dat de beschikbaarheid van glucose en/of het metabolisme ervan de effecten van EPIs op biofilm vorming beïnvloedt. Het blokkeren van de glucose toevoerkanalen bij een extracellulaire glucose concentratie van 0,1% zou moeten resulteren in een vermindering van de biofilmvorming, met name bij stammen met een grote opnamecapaciteit van koolhydraten, aangezien een intracellulaire deficiëntie in glucose zal leiden tot activatie van de tricarboxylzuur (TCA) cyclus. Het is bekend dat verhoging van TCA cyclus intermediären gecorreleerd is aan biofilm repressie. Overvloedige influx van koolhydraten bij een glucose concentratie van 1% zou theoretisch resulteren in een intracellulaire verzuring ten gevolge van een inactieve TCA cyclus en de conversie naar acetaat. Betreffende de CC8-geassocieerde stammen kwamen we tot de hypothese dat het blokkeren van efflux pompen voor het verwijderen van zure metabolieten zoals acetaat, zou resulteren in een bevordering – in plaats van de preventie – van biomassa vorming, terwijl de influx van gluco-

se niet veel beïnvloed zal worden door de overvloedige beschikbaarheid van glucose in het omgevingsmedium.

Ten gevolge van fluctuatie in de tijd van de hoeveelheid glucose en zuurstof in microbiële populaties in biofilm verandert de activiteit van de TCA cyclus van de ingebedde bacteriën ook voortdurend. Unieke accumulatie moleculen en metabole heterogeniteit zijn reeds veelvuldig beschreven in de literatuur. Wij veronderstelden dat de overgang van de opeenvolgende fasen van biofilmontwikkeling specifiek zijn per genetische achtergrond en daarmee tevens ook de expressie van de afzonderlijke transmembraan transporters tijdens de verschillende fasen. Hierdoor zijn EPIs ongeschikt als preventief middel tegen de initiële accumulatie van biomassa.

Het effect van EPIs op reeds bestaande volgroeide biofilm werd ook bestudeerd. De afbraak en/of het uiteenvallen van volgroeide biofilm was minder uitgesproken (CC8) of zelfs volledig afwezig (CC22, CC30 en CC45) in vergelijking met de effecten die zijn bereikt ter preventie van biomassa vorming. Ogenscheinlijk lijkt de penetratiebarrière van volgroeide biofilm die bestaat voor diverse antibiotica ook te bestaan voor de EPIs zelf.

Indien de transmembraan transporters disfunctioneel of downgereguleerd zijn kan de biofilm matrix afvalmaterialen vasthouden evenals uitgescheiden substanties die noodzakelijk zijn voor zelfbescherming van de bacterie in de directe leefomgeving. Zo kunnen β -lactamases (penicillinases en/of methicillinases) opgesloten raken en vervolgens accumuleren in de biofilm. In dat verband zijn "borderline" oxacilline resistente *S. aureus* (BORSA) isolaten potentieel interessant aangezien deze stammen geassocieerd zijn met een overproductie van β -lactamases. **Hoofdstuk 8** beschrijft de resultaten van afdodingsexperimenten van een aantal BORSA isolaten onder planktonische condities met een standaard β -lactam-antibioticum zoals oxacilline en met andere vergelijkbare antibiotica zoals daptomycine, vancomycine en linezolid. Met behulp van een plasmide profiel analyse is gebleken dat de BORSA stammen met een oxacilline MIC van ≤ 2 mg/L en de BORSA referentiestam VU94, een pBORa53-achtig plasmide heeft dat codeert voor β -lactamases inclusief methicillinases. Bij BORSA isolaten met een oxacilline MIC van ≥ 4 mg/L werd een pMW2-achtig plasmide geïdentificeerd. De pBORa53-achtige plasmide bevattende BORSA stammen vertoonden meer hergroei in de afdodingscurves in een oxacilline bevattend groeimedium. Ook bij de andere groep BORSA isolaten met een oxacilline MIC van ≥ 4 mg/L was de afdodingscapaciteit drastisch verminderd in vergelijking met de MSSA referentie stam ATCC 29213, zoals bleek uit de farmacodynamische parameter (EC50 of ϵ C50) die sterk gereduceerd was (ongeveer $10\times$). Aangezien deze BORSA stammen geen methicillinases produceren werd gesuggereerd dat in deze isolaten modificaties in de genen van de penicilline-bindende peptiden (PBPs) 1, 2 en/of 4 zijn opgetreden. Meer onderzoek naar de doseringsstrategie van β -lactam-antibiotica bij verschillende BORSA stammen lijkt noodzakelijk om mogelijk therapiefalen te voorkomen. We hebben vastgesteld dat niet alle BORSA's even interessant zijn voor biofilm gerelateerd onderzoek. Met name de pBORa53-achtige plasmide bevattende BORSA zouden verder geëvalueerd moeten worden onder biofilm condities, aangezien deze stammen het meest gevoelig zijn voor β -lactamase (methicillinase) inductie. Echter, een recent uitgevoerd pilot experiment liet zien dat de pBORa53-achtige plasmide bevattende BORSA uit onze collectie, welke allemaal geassocie-

eerd zijn met MLST CC25, niet in staat zijn grote hoeveelheden biomassa bij 0,1% glucose te genereren in vergelijking met de MLST CC8 geassocieerde MSSA en MRSA isolaten. Desondanks kan het relevant zijn om biofilmonderzoek met BORSA stammen uit te voeren, aangezien deze ook kunnen voorkomen in multi-species biofilm.

Naast de hoofddoelstelling van dit onderzoek is een alternatieve methode geëvalueerd voor het analyseren van data verkregen uit afdodingscurves. Onze aanbeveling is dat aan de al bestaande traditionele eindpunten, als markers voor effectiviteit, zoals “de tijd totdat 99,9% van de bacteriën is afgedood”, of het aantal CFU/mL na een bepaalde tijdsperiode, nieuwe pharmacodynamische parameters toegevoegd zouden moeten worden. De traditionele eindpunten om effectiviteit in uit te drukken zijn geen goede weergave van het totaal aan data afkomstig van afdodingsexperimenten. Processen zoals hergroei of veranderingen in de groeisnelheid van de bacteriën tijdens het experiment worden niet verdisconteerd in de traditionele parameters. Door het absolute verschil in \log_{10} eenheden levende bacteriën te nemen tussen de groeicurve zonder antibioticum en de afdodingscurve in aanwezigheid van een antibioticum kan de oppervlakte tussen beide curven over 24 uur berekend worden (ABC_{0-24h}) en daarmee alle beschikbare data verwerkt worden in een concentratie-effect parameter.